

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協定の条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 48/00, 31/70, C12N 15/19	A1	(11) 国際公開番号 WO00/10608 (43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04550 (22) 国際出願日 1999年8月24日(24.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/251812 1998年8月24日(24.08.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治乳業株式会社 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒104-8381 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 門松健治(KADOMATSU, Kenji)[JP/JP]— 〒468-0014 愛知県名古屋市中平区中平5-1905 ライオンズマンション中平101 Aichi, (JP) 堀場 充(HORIBA, Mitsuru)[JP/JP] — 〒468-0069 愛知県名古屋市中平区表山1-1602 八事表山住宅2-205 Aichi, (JP) 池松真也(IKEMATSU, Shinya)[JP/JP]— 佐久間貞俊(SAKUMA, Sadatoshi)[JP/JP]— 〒250-0862 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社 細胞工学センター内 Kanagawa, (JP)		(71) 出願人 ; および (72) 発明者 村松 喬(MURAMATSU, Takashi)[JP/JP]— 〒468-0011 愛知県名古屋市中平区大字平針字黒石 2845-161 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR ARTERIOSCLEROSIS AND POST-PTCA REANGIOSTENOSIS (54) 発明の名称 動脈硬化およびPTCA術後の血管再狭窄に対する予防・治療剤 (57) Abstract Medicinal compositions for preventing or treating angiostenosis which contain as the main ingredient compounds inhibiting the MK function in vascular tissues. These compositions are useful in preventing and treating reangiostenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) or angiostenosis caused by arteriosclerosis. As the compounds inhibiting the MK function, use can be made of an antisense oligonucleotide which binds to the single-stranded mRNA segment transcribed from MK gene and thus inhibiting the MK protein synthesis in cells and an antibody against MK protein.		

血管組織におけるMKの機能を阻害する化合物を主成分とする、血管の狭窄の防止、あるいは治療のための医薬組成物が提供される。本発明は、経皮的冠状動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA) 後の再狭窄や動脈硬化による血管狭窄のお予防や治療に有用である。

MKの機能を阻害する化合物としては、MK遺伝子から転写された一本鎖mRNAのセグメントに結合し細胞内のMKタンパク合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドや、MKタンパク質に対する抗体などが用いられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YC	ユーゴスラビア
CJ	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

動脈硬化およびPTCA術後の血管再狭窄に対する予防・治療剤

技術分野

本発明は、血管内膜肥厚に起因する疾患の治療・予防剤に関し、さらに詳しくは、MKまたはその阻害剤を有効成分とする治療・予防剤に関する。

背景技術

近年、動脈硬化、特に冠動脈硬化が原因で起こる狭心症や心筋梗塞といった、虚血性心疾患の発症頻度が増加の一途を辿っている。動脈硬化の主要な病理組織像は、局所性に生ずる内膜肥厚や弾性の低下である。この結果、循環障害が生じ、心筋組織への栄養不足及び酸素不足をもたらし、上記病態を引き起こす。

内膜肥厚の病理発生に関して多数の重要な発見がある。その代表的なものが、例えば、肥厚内膜の主な構成細胞は、中膜から遊走してきた平滑筋細胞であることの発見である (Parker, F.: Amer. J. Pathol., 36: 19-53, 1960; Webster, W. S., S. P. Bishop & J. C. Geer: Amer. J. Pathol., 76: 245-264, 1974)。さらに、動脈硬化の進展が、傷害に対する修復反応の結果であるとする説 (Ross, R.: N. Engl. J. Med. 314: 488-500, 1986) は、現在においても動脈硬化の理解の基本となっている。

このような内膜肥厚による血管の狭窄部をバルーンで膨らませ、物理的に血管を拡張させる治療法、すなわち、経皮的冠狀動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA) が現在盛んに行われている。PTCA術は、症状改善率90%以上という優れた効果を実現しているが、PTCA施行後6カ月以内に、同じ部位で30~60%の頻度で再狭窄を生じている。これは、動脈壁傷害部位に対する新生内膜の形成という修復機転が過剰に生じた結果であると病理学的に認識さ

れている(Nobuyoshi, M. et al: J. Am. Coll. Cardiol. 17: 433-439, 1991;)。さらに、この新生内膜は、中膜からの血管平滑筋細胞の遊走、増殖、および細胞外マトリックス増生などによって形成されていることが明らかにされた。一方、新生内膜の形成過程における分子生物学的な機構については、次のような知見が得られている。まず血管平滑筋細胞において、収縮型から合成型への形質転換が観察される。また、細胞増殖を促す次のような物質やそのレセプターの過剰発現が報告されている。

血小板由来増殖因子 (PDGF)、

線維芽細胞増殖因子 (FGF) などの各種増殖因子、

インターロイキンや腫瘍壊死因子 α (TNF- α) などのサイトカイン、

アンジオテンシンII、

トロンビン

このような背景に基づいて、血管平滑筋細胞の遊走と増殖の抑制によって再狭窄が予防できると考えられた。そして動物実験で多くの薬剤の内膜増殖抑制効果が検討され、有効なものについて臨床試験が実施された。しかし、いずれの薬剤も臨床的に有効性が立証されていない (Circulation. 86: 100-110, 1992; Weintraub, W. S. et al.: N. Engl. J. Med. 331: 1331-1337, 1994)。

ミッドカイン (midkine; MK) は、レチノイン酸による胚性腫瘍細胞の分化誘導過程で、早期に発現が誘導される遺伝子の産物として発見された (Kadomatsu, K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318, 1988)。プレイオトロフィン (PTN; 別名HB-GAM) は、神経細胞突起伸長能をもつ結合タンパク質として、新生ラットの脳に発見された (Rauvala, H.: EMBO J., 8: 2933-2941, 1989)。MKとPTNは、発生過程における細胞増殖、生存、及び分化を制御するヘパリン結合性のタンパク質 (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770; Li, Y. et al.: Science 250: 1690-1694, 1990; Rauvala, H.: EMBO J., 8: 2933-2941, 1989; Wellstein, A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2582-258

7,1992) であり、およそ50%の配列相同性をもち (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770; Kuo, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 18749-18752; Tsutsui, J. et al: Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 792-797, 1991)、MKファミリーを形成する (Muramatsu, T.: Dev. Growth Differ., 36: 1-8, 1994)。

成熟MKタンパク質は、塩基性アミノ酸とシステインに富む、121アミノ酸からなる分子量13000タンパク質で、その機能は多岐にわたり、神経細胞の生存促進、神経突起伸長、血管内皮細胞における線溶系亢進、NIH3T3細胞の形質転換、などを挙げることができる。これらに加えて、最近、MKの組織再構築への関与が注目されている。すなわち、脳梗塞巣周囲のグリア細胞や、発生途上で上皮-間質間相互作用が起こるところの主に上皮側などでMKの発現が観察されている。

しかし、動脈硬化やPTCA術後の血管再狭窄とMKタンパク質との関連性についての報告は無い。

発明の開示

本発明は、血管内膜の新生を調節するための新規な薬剤、特に動脈硬化の治療やPTCA術後の血管再狭窄防止効果を持つ新規な薬剤の提供を課題とする。

本発明者らは、次のような知見に基づいて、血管内膜の新生におけるMKの役割を明らかにした。すなわち、ラットの総頸動脈の内皮傷害モデルの血管組織から調製したmRNAについて、RT-PCR及びCompetitive PCRを実施したところ、傷害後7日から10日にかけて、MK mRNAの発現が増大していることを確認した。また、野生型マウス及びMKノックアウトマウスから作製した新生内膜形成モデルにおいて、野生型マウスの新生内膜が、MKノックアウトマウスのそれに比して著明に増大していた。更に、MKノックアウトマウスにMKを注入すると新生内膜の増大が観察された。

これらの知見に基づいて、本発明者らは、血管内膜の肥厚に、MKが重要な役割

を果たしていると考えた。そして細胞におけるMKの機能を阻害することにより、対応する増殖－刺激活性が抑えられ、MKが関与する動脈硬化や、PTCA術後の血管再狭窄防止を実現できることを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下の医薬組成物、並びにそのための化合物をスクリーニングする方法に関する。

- (1) MKの機能を阻害する化合物を主成分として含む、血管狭窄の予防、または治療のための医薬組成物。
- (2) MKの機能を阻害する化合物が、MK遺伝子から転写された一本鎖mRNAのセグメントに結合し細胞内のMKタンパク合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである(1)に記載の医薬組成物。
- (3) MKの機能を阻害する化合物が、MKタンパク質に対する抗体、またはその可変領域を含む断片である(1)に記載の医薬組成物。
- (4) 血管狭窄が、動脈効果、およびPTCA術後の血管再狭窄からなる群から選択される原因によるものである(1)に記載の医薬組成物。
- (5) 次の工程を含む、血管狭窄の予防、または治療のための化合物をスクリーニングする方法。
 - (a) MK発現細胞を候補化合物と接触させる工程
 - (b) MKの機能を阻害する化合物を選択する工程
- (6) (5)に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含む血管狭窄の予防、または治療のための医薬組成物。

本発明は、MKの機能を阻害する化合物を主成分として含む血管再狭窄の予防、または治療のための医薬組成物である。あるいは本発明は、MKの機能を阻害する化合物の、血管再狭窄の予防、または治療における使用に関する。更に本発明は、MKの機能を阻害する化合物の、血管再狭窄の予防、または治療のための医薬組成物の製造における使用に関する。

本発明において、MKの機能とは、MK遺伝子が転写され、タンパク質に翻訳され

てその活性を発現する一連の過程の全てを含む。したがってMKの機能の阻害とは、これらの一連の過程を構成するいずれかのステップにおいてそのステップを阻害することを意味する。本発明において利用可能な化合物を具体的に示せば、たとえば遺伝子の転写とタンパク質への翻訳を阻害するMK遺伝子のアンチセンス核酸やデコイ核酸、MKをコードするmRNAを傷害するリボザイム、MKタンパク質の活性発現に干渉するMKタンパク質結合性の化合物等が考えられる。

本発明者らは、ラット頸動脈の内皮傷害モデルの血管組織より調製したmRNAを試料として、MK、HB-GAM(Heparin-binding Growth-associated Molecule;Pleiotrophin)、Syndecanファミリー (Syndecan-1、Syndecan-3、Syndecan-4)、RPTP- β (PTNの受容体の一つ)、及びグリセロアルデヒドリン酸脱水素酵素(GAPDH; ハウスキーピング遺伝子)(内部標準)についてRT-PCRによってこれらのタンパク質の発現を調べた。その結果、MKについては、7日から14日にかけてmRNA発現が増大していることが認められた(図1 a)。またSyndecan-1は、MKの発現パターンと併せて3日目から14日目にmRNAの強い発現が認められる。Syndecan-1は、MKのレセプターのような働きをすると考えられているSyndecanファミリーの一つである。

一方、MKファミリーであるPTNの発現は、7日目頃に一過性に発現が増大している。また、PTNのレセプターと考えられるRPTP- β (J.Biol.Chem.271,21446-21452, 1996)は、やはりHB-GAMの発現が上昇しピークに達すると考えられる術後3日から7日にかけてmRNAが強く発現していることが認められる。内部標準としたGAPDHは、術後の日数に関係なく一定の発現を示していることが認められる(図1 e)。

また、術後のMKの発現量の変化を、Competitive PCRで調べると、GAPDHは、術後14日目まで常に同様の発現量を示していることが認められる(10^5 copies/ μ l)のに対して、MKは術後7日目に発現が10倍増大していることが認められる(図2)。すなわち、MKは、術後7日目にmRNAの発現が最高に達するような発現形式で出現することが示される。3日目、7日目、14日目の各組織をウエスタン・ブロット解

析してみると、確かにMKタンパク質が確認され、術後7日目にも多くの量のMKタンパク質が発現することが明らかである(図2)。以上の結果から、MKは、そのファミリーであるPTNとは、mRNAの発現パターンを異にし、MKのみが新生内膜の形成に協調した形で発現してきていると考えられる。

内皮傷害後の新生内膜の形成について(Circulation, 96: 4333-4342, 1997)、14日目のラットの血管組織をヘマトキシリン・エオジン染色してみると、内膜が形成されず、外膜の次に中膜がそのまま増大しており、血管平滑筋の増殖が確認された(図4 b, c)。これに対し、処置を施していないラットの血管内膜部は、血管がきれいに外膜、中膜、および内膜とから形成されていた(図4 a)。さらに、14日目のラットの血管組織における、抗MK抗体(特願平9-205332)による免疫組織化学的染色の結果では、この増殖している血管平滑筋細胞の部分が染色された(図4 d)。これらの結果から、平滑筋細胞の増殖にはMKが関与していることが明らかである。したがって、MKの機能を阻害することでPTCA術後の再狭窄の予防を実現できると考えられる。また、PTCA術後の血管の狭窄と同様の機構が動脈硬化巣においても生じていると考えられている(Nature, 362: 801-809, 1993; Circulation, Res., 77: 445-465, 1995)ことから、MKの機能の阻害を通じて動脈硬化の予防や治療を達成することもできる。

MKの機能の阻害は、たとえばMKタンパク質合成そのものの阻害によって達成することができる。MKタンパク質合成は、MK遺伝子の転写、発現、あるいは翻訳の抑制によって阻害される。この目的のために、たとえばアンチセンス核酸やデコイ型核酸を利用することができる。アンチセンス核酸技術は、遺伝子の相補性を利用し、特定の遺伝子の発現を抑制するために、目的の遺伝子とハイブリダイズする核酸配列をもった遺伝子か、人工的に合成した短い核酸(アンチセンスオリゴ)を導入するものである。それに対し、デコイ型核酸医薬は、特定の転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、活性化される遺伝子群の抑制を行うものである。

アンチセンス技術は、遺伝子産物を阻害する非常に特異的で効力の強い方法を提供する (Stein & Chang, Science 261: 1004-1012, 1993)。アンチセンスオリゴヌクレオチドをmRNA標的物にハイブリダイズさせると、相応する遺伝子産物の発現を多重機構で阻害することができる。「翻訳停止」状態では、標的mRNAとオリゴの相互作用によってリボソーム複合体の作用が抑えられ、それによりmRNAのタンパク質への翻訳が阻止される (Haeuptle et al.: Nucl. Acids. Res. 14: 1427, 1986)。ホスホジエステルDNAまたはホスホロチオエートDNAオリゴの場合では、標的となるRNA配列がそのDNAオリゴマーにハイブリダイズすると、細胞内RNase Hがその標的RNA配列を速やかに消化することができる (Walder & Walder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5011, 1988)。ある種のオリゴヌクレオチドは、目的の遺伝子を含む二本鎖の標準的なゲノムDNAとともに「トリプレックス」すなわち三重らせん構造を形成することが可能で、それによってRNAポリメラーゼによる転写が妨げられる (Giovannangeli et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 10013, 1993)。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には短いDNA配列であり、通常その長さは10～50塩基であって、相応する標的mRNAの特異的な領域に相補的である。標的転写物とアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、相補的な塩基対を形成する結果、高い特異性を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、標的部位に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの接近しやすさ、化学修飾、及び二次構造等に影響される (Stein et al.: Cancer Research 48: 2659, 1988)。

発現を抑制すべきmRNAに対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい長さを選択するためには、次のような要素を考慮する必要がある。まず、10～15塩基のような短いオリゴヌクレオチドは、高い細胞侵入性を示す一方、遺伝子特異性が低い。これとは対照的に、20～30塩基の長いオリゴヌクレオチドは、良好な特異性を示す一方、細胞への取り込み速度は、小さくなる。mRNA標的配列に接

近する能力も重要である。たとえば標的とされるmRNAに存在するループ形成領域は、1本鎖で存在する可能性が高いためにアンチセンスオリゴヌクレオチドの接近が容易であり、標的塩基配列として有望である。これらの要素を考慮して、適切な標的配列とアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さを選択することは、当業者には自明である。

本明細書における「オリゴヌクレオチド」という用語は、DNAおよびRNAのデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド構造のような天然に存在するオリゴマーの核酸部分、ならびに天然に存在する核酸に結合する能力のある人工アナログの両方を包含する。本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって、またはメチルホスホネート、ホスホロチオエート、もしくは他の結合により結合したアナログによって、結合したリボヌクレオチドモノマーに基づいていけばよい。またそれらは、基本構造または他の修飾は変化しているが、天然に存在するDNA構造およびRNA構造に結合する能力を保持したままである、モノマー部分を有していてもよい。このようなオリゴヌクレオチドは、当業者に周知の方法、例えば市販の機械およびPerkin-Elmer/Applied Biosystem (Foster City, CA)より入手できる試薬を用いる方法によって調製することができる。これらの装置は、100塩基程度の長さのオリゴヌクレオチドをナノモル単位で合成することができる。

ホスホジエステル結合したオリゴヌクレオチドは、血中で、あるいは細胞内部でヌクレアーゼの作用を特に受けやすい。そのため好適な態様において、本発明に用いるオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ抵抗性であることが明らかになっているホスホロチオエート結合またはメチルホスホネート結合したアナログである (Stein et al.: Cancer Research 48: 2659, 1988)。

また、アンチセンスRNAの形態でのMKオリゴヌクレオチドを、目的とする細胞内で標準的なDNA発現ベクターから一時的に発現させることができる。MK DNA配列は、標準的なプラスミドから発現ベクターへとクローニングすることができ、その発

現ベクターは、内在するオリゴヌクレオチドをより高いレベルで、または、より効果的に発現できるような特性を備えている。最低限、これらの構築物は、挿入されたDNA配列の転写を開始させる真核生物のプロモーター配列を必要とする。好ましい発現ベクターは、発現を高レベルにまで誘導することができるものである。これは、適当な宿主細胞において、下流の配列の転写を増加させるような調節領域を付加することによって達成される。

例えば、MKアンチセンスオリゴ発現ベクターは、プラスミドpHIL301-MKの一本鎖cDNAから得られる適切な断片を増幅させるPCRを利用して構築することができる。PCR反応を行う際に好適なオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列は当業者であれば適切な配列をMKのcDNA配列 (GenBank Acc.No. J05447) に基づいて設定することができる。オリゴヌクレオチドの合成法および精製法は、公知である。PCR産物は、プラスミドにサブクローニングされる。これに関連して「クローニングベクター」は、プラスミド、コスミド、または、バクテリオファージのようなDNA分子であり、それは、原核生物の宿主内で自律複製できる。クローニングベクターは、一般的に、そのクローニングベクターを用いて形質転換された細胞の同定および選択に用いるのに好適なマーカー遺伝子だけでなく、そのベクターの必須の生物機能を失わずに、外来のDNA配列が検出可能な状態で挿入され得る制限エンドヌクレアーゼ認識部位を一個所または少数個所含んでいる。マーカー遺伝子は、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性の遺伝子を含む。クローニングされたアンチセンス断片は、適当な細菌細胞をクローニングベクターを用いて形質転換し、適切な抗生物質の存在下でその細菌の宿主細胞を増殖させることによって増幅される。続いて、細菌の宿主細胞に対してPCR法を行い、MKアンチセンス配向クローンについてスクリーニングする。

クローニングしたアンチセンス断片は、クローニングベクターより開裂され、そして発現ベクターに挿入される。好適な発現ベクターには、一般的に、(1) 細菌宿主の複製開始点および抗生物質耐性マーカーをコードする原核細胞のDNA

因子、(2) プロモーターのような転写の開始を調節する因子、および(3) 転写の終結／ポリアデニル化配列のような転写工程を調節するDNA因子が含まれる。哺乳動物の宿主では、転写調節および翻訳調節シグナルは、好ましくは、例えば、アデノウイルス、ウシのパピローマウイルス、または類似のウイルスなどのウイルス源由来である。これらのウイルスにおいて、調節シグナルは、高レベルの発現をもたらす特定の遺伝子に参与している。好適な転写調節配列および翻訳調節配列はまた、例えばアクチン、コラーゲン、ミオシン、およびメタロチオニン遺伝子といった、哺乳動物の遺伝子から得ることもできる。転写調節配列は、RNA合成をうまく開始させることのできるプロモーター領域を含んでいる。好適な真核細胞のプロモーターには、マウスメタロチオニン1遺伝子プロモーター、ヘルペスウイルスのTKプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、およびサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。

また、バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターのような原核細胞のプロモーターは、その原核細胞のプロモーターが真核細胞のプロモーターによって調節されるのであれば、融合遺伝子発現を調節する際に用いることができる。

哺乳動物細胞における発現に好適なベクターは、哺乳類のエンハンサープロモーター配列から高レベルの転写を提供するベクターである。クローニングされたMKアンチセンスベクターは、細菌宿主細胞内で増幅され、細胞から単離され、前述のようにして解析される。

アンチセンス配列を利用するためのもう一つの可能な方法は、遺伝子治療によるものである。通常レトロウイルス由来であるウイルス様ベクターは、血管肥厚組織や血管内膜へのアンチセンス構築物の取り込みおよび発現のための担体として有用であることが示されるであろう。一般的に、該ベクターは、インビボで非複製性であり、目的としない非標的細胞の感染を妨げる。このような場合、欠如している複製能をインビトロで与え、それによりアンチセンスベクターを増幅さ

せ包み込むことができるヘルパー細胞系が供給される。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、MK cDNAのオープンリーディングフレームのいかなる部分に由来するものであってもよい。好ましくは、(1) 翻訳開始部位の周辺にあり、(2) ループ構造を形成する、mRNA配列が標的とされる。ヒトゲノムのサイズに基づく、統計解析により、およそ14-15塩基対の長さのDNAセグメントがゲノム内に特有の配列を有していることが示されている。したがって、MK RNAの標的配列の特異性を確実にするためには、アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さを少なくとも14塩基、好ましくは15塩基とするのが望ましい。したがって、本発明により企画されるオリゴヌクレオチドには、MKのcDNA配列の1-14位、1-15位、1-16位、1-17位、1-181位、1-19位、2-16位、3-17位などに相当するヌクレオチドが含まれる。

本発明におけるMKの機能を阻害する化合物には、MKタンパク質に結合してその活性の発現に干渉する物質を利用することもできる。このような化合物には、MK中和抗体、ヘパリン (Kaneda, N. et al., J. Biochem. 119, 1150-1156 (1996) 参照)、あるいはMKの結合部位を奪って活性を抑えるヒト・リュードカン (Human Ryudocan) (Kojima, T., Katsumi, A., Yamazaki, T., Muramatsu, T., Nagasaka, T., Ohsumi, K., and Saito, H., J. Biol. Chem. 271, 10, 5914-5920 (1996) 参照) 等を挙げることができる。

本発明で使用される抗MKタンパク質抗体は、公知の手段を用いて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗MKタンパク質抗体として、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体は、公知の方法に準じて作製することができる。例えばヒトMKのcDNAはクローニングされ、そのDNA配列とそれにコードされるアミノ酸配列が報告されている。モノクローナル抗体は、MKタンパク抗原全体に対しても、或いはその一部に対しても作製することができる。特に好ましいのは、可溶性型のヒトMKタンパク抗原に対して作製された抗体である。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には、ケーラーとミルスタインの方法 (Kohler, G. & C. Milstein, Nature 256: 495-497, 1975) に準じて、以下のようにして作製できる。すなわち、MKタンパクを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるMKタンパクは、ヒトMKについては、特開平9-95454に記載のMK遺伝子/アミノ酸配列を用いることによって得られる。

MKは、本発明で使用される抗MK抗体取得のための抗原として使用される限りそのアミノ酸残基数を問わない。MK遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のMKタンパクを公知の方法で精製し、この精製MKタンパクを感作抗原として用いればよい。感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、齧歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

MKを動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、MKを哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、MKをPBSや生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後哺乳動物に4～21日毎に数回投与する。また、免疫時に適当な担体を使用することができる。このようにして免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞を取り出して細胞融合に用いる。好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。

上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞と

しては、公知の各々の細胞株、例えば P 3 (P3x63Ag8.653) (Kearny, J. F. et al.: J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979)、P3x63Ag8U.1 (Yelton, D. E. et al.: Current Topics in Microbiology 81: 1-7, 1978)、NS-1 (Kohler, G. & Milstein, C.: Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al.: Cell, 8: 405-415, 1976)、SP2/0 (Shulman, M. et al.: Nature, 276: 269-270, 1978)、F0 (de St. Groth, S. F. & Scheidegger, D.: J. Immunol. Methods, 35: 1-21, 1980)、S194 (Trowbridge, I. S.: J. Exp. Med., 148: 313-323, 1978)、R210 (Galfre, G. et al.: Nature, 277: 131-133, 1979)、等が好適である。

上記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は、基本的には、公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. & Milstein, C., Methods Enzymol. 73: 3-46, 1981) 等に準じて行うことができる。具体的には、前記細胞融合は、例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス等が使用され、さらに、融合効率を高めるため、ジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することができる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して、免疫細胞を 1～10倍とするのが好ましい。細胞融合に用いる培養液としては、例えば、ミエローマ細胞株に好適な RPMI 1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を上記培養液中でよく混合し、予め 37°C 程度に加温した PEG 溶液、例えば、平均分子量 1000～6000 程度の PEG 溶液を、通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して、上清を除去する操作を繰り返すことにより、ハイブリドーマの生育に好

ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単一クローニングが行われる。

また、本発明では、組換え型抗体や改変抗体が使用できる。組換え型抗体としては、例えば、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んでこれを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebæk, C. A. K. & Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990）。改変抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体が使用できる。キメラ抗体は、ヒト抗体以外の抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し、産生させることにより得られる（EP 125023, PCT W096/02576）。

本発明で使用される抗体は、MKに結合しMKの活性を阻害するかぎり、抗体の断片や修飾物であってもよい。抗体の断片としては、例えば、Fab、F(ab')₂、FvまたはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。

本発明において、MKの機能を阻害する物質として、抗MK抗体を用いる場合の使用形態は、一般の抗体療法（例えば、静注点滴）に準じる。

MKの機能を阻害する化合物を有効成分とする本発明による薬組成物は、公知の製剤学的製造法によって製剤化した後に、血管内膜肥厚に起因する疾患などの予防又は治療を目的として投与される。例えば、薬剤として一般的に用いられる適当な担体または媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油（例、ゴマ油、オリ-

ブ油等)、着色剤、乳化剤(例、コレステロール)、懸濁剤(例、アラビアゴム)、界面活性剤(例、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油系界面活性剤)、溶解補助剤(例、リン酸ナトリウム)、安定剤(例、糖、糖アルコール、アルブミン)または保存剤(パラベン)等と適宜組み合わせ、生体に効果的に投与するのに適した注射剤、経鼻吸収剤、経皮吸収剤、経口剤等の医薬用製剤、好ましくは注射剤に調製することができる。例えば、注射剤の製剤としては、凍結乾燥品や、注射用水剤や、浸透圧ポンプに封入した形等で提供できる。

注射剤は、有効成分である化合物を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

経口投与用の錠剤は、有効成分である化合物に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮整形することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

本発明による医薬組成物を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

本発明の医薬組成物における有効成分の含有量は、その投与形態と必要な投与

量とに基づいて決定される。たとえば、経口の場合、通例容認される1日の有効経口用量は、抗MKタンパク質抗体として、約0.1～約1000mg/日、さらに一般的には、約50～約200mg/日であろう。

本発明は、血管再狭窄の予防、または治療のための化合物をスクリーニングする方法をも提供する。MKの機能の阻害を通じて、血管再狭窄の予防、または治療効果が達成されることから、MKの機能の阻害を指標とすることにより、有効な化合物のスクリーニングを行うことができる。MK合成の阻害について候補化合物をスクリーニングすることができるいくつかの方法がある。例えば、MKの合成が盛んな数多くの細胞系が存在する。これらの細胞により産生されるMKのレベルは、例えば、放射免疫沈降、ウェスタンブロット、RIA、またはELISAにより測定することができる。MK産生細胞を有効な候補化合物で処理することにより、MKレベルの減少が引き起こされる。

また、MK活性を直接、解析することが可能である。前述のように、MKのレベルが上昇した細胞系が利用可能である。これらの細胞は、また、軟寒天内コロニー形成のようなある異常な挙動により特徴づけられる。特に内皮細胞の増殖の増加を測定することができ、これはインビボの血管形成のための有用なインビトロモデルである。このような細胞を有効な候補化合物で処理することにより、細胞の挙動の変化が生じ、有用な化合物を同定するために利用することができる。前述のようなアッセイは、体内の血管内皮細胞増殖のための標準的なモデルとして有用である。選択された候補化合物は、動物モデル系でインビボの効率および安全性を試験することができる。

図面の簡単な説明

図1は、ラットの実験的再狭窄モデルの血管組織における経時的なmRNAの発現を、RT-PCRにより検出した結果を示す図である。

(a)はMKの、(b)はPleiotrophin(PTN)の、(c)は、Syndecan-1、Syndecan-3、及び

Syndecan-4の、(d)は β の、(e)はGAPDHのそれぞれについてのmRNAの経時的な発現の変化を示す。

図2は、ラットの実験的再狭窄モデルの血管組織におけるmRNAの経時的な発現の変化を競合的PCR法により定量的に検出した図である。GAPDHは内部標準として利用した。

図3は、ラットの実験的再狭窄モデルの血管組織におけるMKタンパク質発現量の経時的な変化をウエスタン・ブロット法によって解析した結果を示す図である。

図4のa～cは、ラットのカテーテル傷害後、14日経過における血管組織のヘマトキシリン・エオジン (H.E) 染色パラフィン切片を示し、aは対照群の14日経過におけるH.E図を、bは再狭窄モデル作製後14日経過におけるH.E図を、cはaの拡大図を、それぞれ示す。

図5は、ラットのカテーテル傷害後、14日経過における血管組織の血管組織のパラフィン切片を、抗MKポリクローナル抗体、及び2次抗体として抗ウサギIgG抗体 (Jackson laboratory) を用いて免疫組織化学染色した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

[実施例1] 再狭窄モデルの作製

以下の方法でラット頸動脈balloon injuryモデルを作製した。

15～20週令の雄性ウイスターラット (体重：350～400 g) は、腹腔内にネブタール50mg/kgを投与して麻酔した。ラットの四肢を固定板に固定した。頸部を正中切開し外頸動脈を剖出させた。つぎに、総頸動脈から、内頸動脈と外頸動脈に分岐する部分の外頸動脈を、2本の糸で適当な間隔をあけて一周させる。遠位部は結紮し、近位部は結紮できるようにしておく。そして、2本の糸間の外頸動脈

を小さく切開した。この切開部から、2 F フォガティールカテーテルを挿入し、総頸動脈までカテーテルを進め、さらにその起始部まで進めた。そして、総頸動脈の起始部で、バルーンを、生理食塩水で少し抵抗があるくらいに膨らませ、そのまま回転させながらゆっくりと頸動脈部分岐部までバルーンを引き戻した。バルーンを収縮させた後、再びカテーテルを起始部まで進め、バルーンを膨らませ引き戻す、という操作を、さらに2回繰り返した。この操作により血管内皮が剥離され、中膜平滑筋に傷害が加わり、肥厚内膜が形成される。カテーテルを引き抜くと同時に近位部の糸を結紮した。手術部を縫合して、ラット頸動脈balloon injuryモデル（再狭窄モデル）を作製を完了した。ラットは麻酔から回復した後、個別のケージに戻した。

〔実施例2〕血管内膜肥厚とMK発現との解析

再狭窄モデルを用いて、内膜肥厚とMK発現との関連を、1) PCR、2) ウェスタン・ブロット、及び3) 組織形態観察により解析した。

(1) PCRによるMK発現の検出

コントロール群として正常ラット（3匹）、再狭窄モデル群として、カテーテルによる傷害後、3時間、3日、7日、及び14日経過した各モデル（各3匹）を設定した。

(a) RT-PCRによる血管組織の各タンパク質mRNAの検出

コントロール群、再狭窄モデル群（3時間、3日、7日、及び14日経過）における血管組織のMK、PTN、Syndecan-1、Syndecan-3、Syndecan-4、RPTP- β 、及びGAPDH（内部標準）のmRNA発現量を、RT-PCRにより検出した。各組織よりmRNAを調製し、これを出発材料としてRT-PCRを行った。プライマーは、既知の部分の最適と考えられる部分を選び設定した（クラボウ株式会社）。用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

MKセンスプライマー

5'-gccgatccatgcagcaccgaggcttcttc-3' (30mer) (配列番号：1)

MKアンチセンスプライマー

5'-actagcataatcaggaacatcatagtcctttccttttccttt-3' (42mer) (配列番号 : 2)

PTNセンスプライマー

5'-actggtgccgagtgcaaaca-3' (21mer) (配列番号 : 3)

PTNアンチセンスプライマー

5'-gagtttgccacagggcttgga-3' (21mer) (配列番号 : 4)

syndecan-1センスプライマー

5'-ggaggcacttctgtcatcaa-3' (20mer) (配列番号 : 5)

syndecan-1アンチセンスプライマー

5'-agcacttccttcctgtccaa-3' (20mer) (配列番号 : 6)

syndecan-3センスプライマー

5'-gatgagccagaggtgccagt-3' (20mer) (配列番号 : 7)

syndecan-3アンチセンスプライマー

5'-gccacctacgatcacagcta-3' (20mer) (配列番号 : 8)

syndecan-4(ryudocan)センスプライマー

5'-gaagacgctgggggccttgag-3' (21mer) (配列番号 : 9)

syndecan-4(ryudocan)アンチセンスプライマー

5'-tctgaggggacacggatgcca-3' (21mer) (配列番号 : 10)

RPTP- β センスプライマー

5'-atcgatccccgttctcaacacatccctgaat-3' (32mer) (配列番号 : 11)

RPTP- β アンチセンスプライマー

5'-cgtctcgagctaagcatctggagaaaatgtctc-3' (33mer) (配列番号 : 12)

GAPDHセンスプライマー

5'-gaccacagtccatgccatcac-3' (21mer) (配列番号 : 13)

GAPDHアンチセンスプライマー

5'-gtagccgtattcattgtcatacc-3' (23mer) (配列番号 : 14)

PCR反応は、熱変性：94°C30秒（1サイクル目は1分）、アニーリング：55°C30秒、伸長反応：72°C30秒をMKの場合28サイクル、PTNの場合35サイクル、Syndecan-1、3、及び4の場合33サイクル、RPTP- β の場合35サイクル、GAPDHの場合上記全ての条件のサイクル、を繰り返した。以上のRT-PCRの結果を図1の(a)、(b)、(c)、(d)、および(e)に示す。

(b) competitive PCR (競合的PCR)によるMKmRNAの定量

コントロール群、再狭窄モデル群（3時間、3日、7日、及び14日経過）における血管組織のMK及びGAPDHのmRNAの発現量を、競合的PCR法によって定量的に調べた（図2のa及びb）。target及びcompetitorのバンドの濃さは目視で判定した。すべて上、下(targetとcompetitor)2つのバンドがほぼ同じ濃さのものが、それぞれ中央に位置するように並べた。MKについては、コントロール群(C)でcompetitorのコピー数が 10^7 でtargetと同じであったのが、3時間後では 10^6 と同じとむしろ減少するが、7日後には 10^8 と同じとなり増加している。すなわち、MKでは7日後にはコントロールの約10倍量のmRNAが発現していることが認められた。これに対し、GAPDHでは、コントロール群(C)、3時間後、3日後、7日後、14日後の全てにおいて 10^5 と同量であり、解析に使用した各サンプル間の全RNA量にばらつきがないことが認められた。

(2) ウェスタンブロット解析

コントロール群として正常ラット（2匹）、再狭窄モデル群として、カテーテルによる傷害後、3日、7日、及び14日経過した各モデル（各2匹）を設定した。

血管組織でのMKタンパク発現量をウェスタンブロット法により解析した（図3）。図3から、再狭窄モデル作製後3時間経過においては、MKタンパク発現量は、対照群と差が認められないが、7日経過においては、MK発現量は最大となり、14日経過においては、発現量は減少しているものの、なお、対照群に比較してMKタンパク発現量の増加が認められる。

(3) 組織形態の解析

コントロール群として正常ラット（3匹）、再狭窄モデル群として、カテーテルによる傷害後、3日（3匹）、7日（4匹）、及び14日経過（3匹）した各モデルを設定した。

(a) ヘマトキシリン・エオジン染色

4%パラホルムアルデヒド（和光純薬工業株式会社）固定液を用いて血管組織切片を作製した。全自動包埋機を使用してパラフィン包埋後、5 μ m切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色（以下、H.E染色と称する）した（図4 a、b、およびc）。aは対照群におけるH.E図を、bはカテーテルによる傷害後14日経過におけるH.E図を、cはaの拡大図を、それぞれ示す。図から明らかなように、コントロール群においては、内膜の肥厚が認められなかったのに対し、カテーテルによる傷害後14日経過した再狭窄モデルにおいては、顕著な肥厚が観察された。

(b) 免疫組織化学

カテーテルによる傷害後14日経過における血管組織切片を、抗MKポリクローナル抗体、及び2次抗体として抗ウサギIgG抗体（Jackson laboratory）を用いて免疫組織化学染色した（図5）。図から明らかなように、新生内膜部分に著明なMKタンパク質の発現が認められる。

[実施例3] MKノックアウトマウスの血管内膜新生に対するMKの影響

再狭窄とMK発現との関連を、よりin vivoに近い状態で調べるため、MK遺伝子ノックアウトマウスを用いて、血管内膜の新生に対するMKの影響を調べた。MKは、特開平9-95454の実施例に記載の方法で作製したMKを用いた。

MKノックアウトマウスは、MK遺伝子のエクソン2の一部と3の一部を破壊したノックアウトマウス（Homo）（Gene Cells, 1998 Dec ; 3(12) : 811-822）（129/Sv系、10~12週令の雄性(25~30g)）を用いた。

野生型マウス（129/Sv系、10~12週令の雄性(25~30g)）（10匹）、MKノックアウトマウス（10匹）、MKノックアウトマウス（生理食塩水注入ポンプ植え込

み) (10匹)、MKノックアウトマウス (MK注入ポンプ植え込み) (10匹) の4群を設定した。

各群は、ネンブタール50mg/kgをマウスの腹腔内に投与し、麻酔をかけた。マウスは、総頸動脈分岐部を結紮し、新生内膜形成モデルを作製した。マウスは相対的に血圧が高いためか、血栓による完全閉塞は起こりにくく、圧負荷による刺激で新生内膜が形成される (Arterioscler Thromb Vasc Biol.1997;17:2238-2244)。

新生内膜を病理学的に解析したところ、野生型マウスの新生内膜が、MKノックアウトマウスの新生内膜に比べ、顕著に増大していることが観察された。これらの結果と、実施例1の結果から、MKが血管新生内膜形成に関与している可能性が推察された。

そこで、MKノックアウトマウスを、MK投与群と生理食塩水投与群 (コントロール群) の2群 (1群10匹) に分け、新生内膜形成モデルを作製した。MK 0.8mg/mLを100 μ L注入したポンプ (Micro-Osmotic Pump[®]alet-MODEL 10070[®]:alza;0.5 μ L/hr.で7日間有効)、あるいは生理食塩水を注入したポンプをマウス腹部皮下に植え込み、7日で交換、14日目まで留置した後、屠殺して血管内膜の形成状態を解析した。

血管は、4%パラホルムアルデヒド (和光純薬工業株式会社) で固定した。全自動包埋機を使用してパラフィン包埋後、5 μ m切片を作製し、H.E.染色して観察した。その結果、MK投与群は、新生内膜が、コントロール群に比較して過剰に形成されていた。この結果により、MKが血管拡張術後再狭窄に関与していることが、ノックアウトマウスを用いたin vivo実験で間接的に証明された。

産業上の利用の可能性

本発明による医薬組成物の投与によって、動脈硬化やPTCA術後の血管再狭窄に起因する血管の狭窄症状が効果的に予防される。あるいは本発明の医薬組成物は、進行した血管の狭窄症状を緩和するための治療用途においても有用である。

請求の範囲

1. MKの機能を阻害する化合物を主成分として含む、血管狭窄の予防、または治療のための医薬組成物。
2. MKの機能を阻害する化合物が、MK遺伝子から転写された一本鎖mRNAのセグメントに結合し細胞内のMKタンパク合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項1に記載の医薬組成物。
3. MKの機能を阻害する化合物が、MKタンパク質に対する抗体、またはその可変領域を含む断片である請求項1に記載の医薬組成物。
4. 血管狭窄が、動脈効果、およびPTCA術後の血管再狭窄からなる群から選択される原因によるものである請求項1に記載の医薬組成物。
5. 次の工程を含む、血管狭窄の予防、または治療のための化合物をスクリーニングする方法。
 - (a) MK発現細胞を候補化合物と接触させる工程
 - (b) MKの機能を阻害する化合物を選択する工程
6. 請求項5に記載の方法によって選択された化合物を有効成分として含む血管狭窄の予防、または治療のための医薬組成物。

1 / 5

☒ 1

(a) MK



C 3h 3d 7d 14d

(b) HB-GAM



C 3h 3d 7d 14d

(c)

Syndecan-1

Syndecan-3

Syndecan-4



C 3h 3d 7d 14d C 3h 3d 7d 14d C 3h 3d 7d 14d

(d) RPTP- β



C 3h 3d 7d 14d

(e)

GAPDH

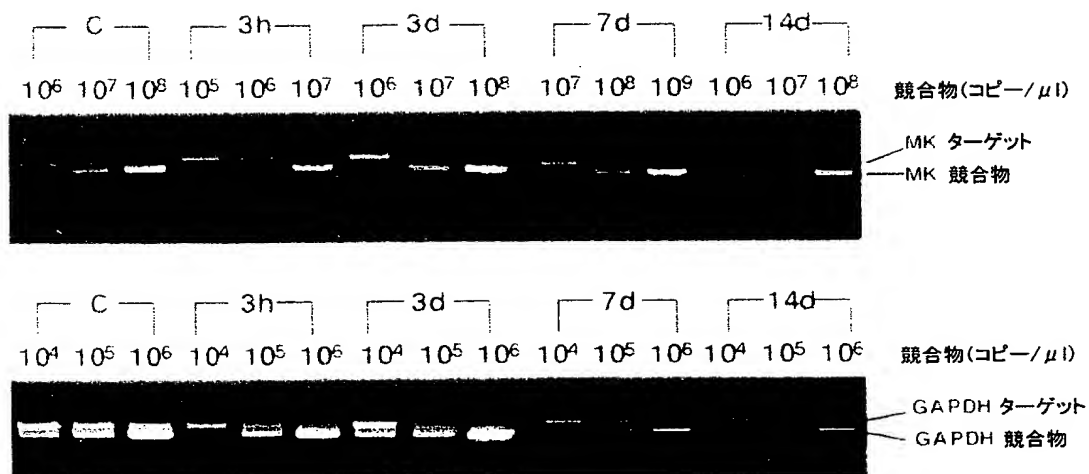


C 3h 3d 7d 14d

2 / 5

図 2

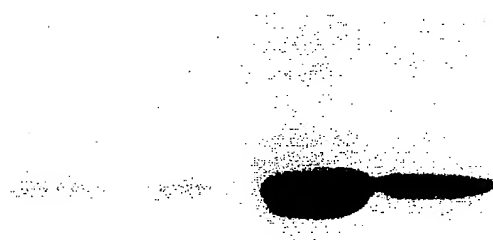
競合的PCR



3 / 5

図 3

ウェスタンブロット



C 3d 7d 14d

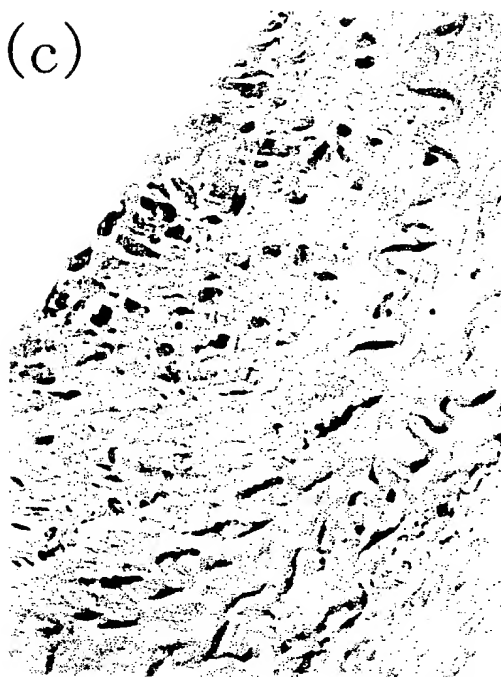
4 / 5

図 4

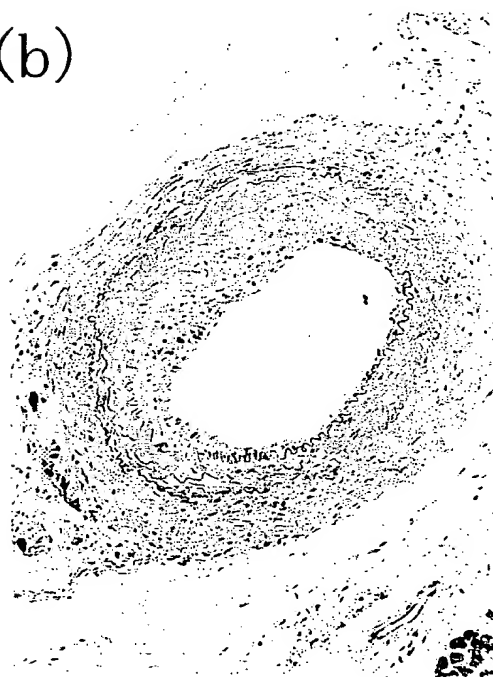
(a)



(c)



(b)



5 / 5

図 5



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Milk Products Co., Ltd.

明治乳業株式会社

<120> Pharmaceutical compositions for the prevention or
treatment of atherosclerosis and restenosis after PTCA
operation.

動脈硬化およびP T C A術後の血管再狭窄に対する予防・治療剤

<130> M1-105PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-251812

<151> 1998-08-24

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

gccggatcca tgcagcacccg aggcttcttc

30

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

actagcataa tcaggaacat catagtcctt tccttttcct tt

42

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

actggtgccg agtgcaaaca a

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gagtttgcca caggccttg a

21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 5

ggaggcactt ctgtcatcaa

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

agcacttcct tcctgtccaa

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gatgagccag aggtgccagt

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gccacctacg atcacagcta

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gaagacgctg ggggccttga g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

tctgagggga cacgcatgcc a

21

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

atcggatccc cgttctcaac acatccctga at

32

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

cgtctcgagc taagcatctg gagaaaatgt etc

33

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gaccacagtc catgccatca c

21

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gtagccgtat tcattgtcat acc

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ A61K45/00, A61K48/00, A61K31/70, C12N15/19 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ A61K45/00, A61K48/00, A61K31/70, C12N15/19 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHYAMA, Y. et al., "Isolation and identification of midkine and pleiotrophin in bovine follicular fluid" Mol. Cell Biol., 1994, Vol.105, p.203-208, See "Introduction" and "Fig.3"	1 - 6
X A	JP, 8-27021, A (Mitsui Toatsu Kabushiki Kaisha), 30 January, 1996 (30.01.96), Claims, Example 2, (Family: none)	1, 4, 6 2, 3, 5
A	WANG, S., et al., "Midkine exists in astrocytes in the early stage of cerebral infarction" Dev. Brain Res., March 1998, p.205-209, Full text	1 - 6
A	JP, 8-73498, A (Mitsui Toatsu Kabushiki Kaisha), 19 March, 1996 (19.03.96), Full text (Family: none)	1 - 6
PA	WO, 99/16463, A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 08 April, 1999 (08.04.99), See summary, (Family: none)	1 - 6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 November, 1999 (15.11.99)		Date of mailing of the international search report 24 November, 1999 (24.11.99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

2

2

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04550

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A 61K 45/00, A 61K 48/00, A 61K 31/70,
C 12N 15/19

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A 61K 45/00, A 61K 48/00, A 61K 31/70,
C 12N 15/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	OHYAMA, Y. et al., 'Isolation and identification of midkine and pleiotrophin in bovine follicular fluid' Mol. Cell Biol., 1994, Vol. 105, p. 203-208, 「Introduction」及び「Fig. 3」参照	1 - 6
<u>X</u> A	J P、8-27021, A (三井東圧株式会社), 30. 1月. 1996 (30. 01. 96), 請求の範囲、実施例 2 参照, ファミリーなし	1, 4, 6 2, 3, 5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WANG, S., et al., 'Midkine exists in astrocytes in the early stage of cerebral infarction' Dev. Brain Res., March 1998, p.205-209, 全文参照	1 - 6
A	J P、8-73498, A (三井東圧株式会社), 19. 3月. 1996 (19. 03. 96), 全文参照, ファミリーなし	1 - 6
P A	WO, 99/16463, A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 8. 4月. 1999 (08. 04. 99), 要約参照, ファミリーなし	1 - 6